发放日期	2024.9.12
归档日期	
指导教师（签字）	
第 1 本	共　　本

苏州大学研究生科研记录本

（自然科学类专业用）

论文题目：miR-214调控乳腺退化过程中微环境重塑介导产后乳腺癌发生的机制研究

培养单位：放射医学与防护学院

专　　业：放射医学（理学）

姓　　名：黄文慧

学　　号：20244220021

指导教师：刘行昂

使用起止时间：2024.9.24-2025.11.20

记录起止页码：4-150

科研名称：3PNC 注射（WT）浓度测试　日期：2025 年 1 月 14 日

原位注射浓度测试

材料准备：胰岛素注射器（1ml）×2、10%水合氯醛（2024.11.2 配）
3PNC细胞、剃毛刀、脱毛膏、灭菌器械（2025.1.12 灭菌）、缝合针线
加热垫板

过程：1）材料准备：
器械（剪刀、镊子、缝合针）提前一天灭菌、实验前泡于75%乙醇中；
细胞消化及准备：3PNC（浓度 2.26×10^7 个/ml）
吸去原基 → PBS洗 → 胰酶消化 min → DMEM停止消化 → 800rpm, 3min
→ 吸去DMEM → 500ul PBS重悬，浓度 2.26×10^7 个/ml、2.17×10^7 个/ml 约2000万/ml
2）小鼠麻醉：60ul/只鼠；约5min麻醉（用棉签碰小鼠眼未闭合）
3）注射原味瘤：（打耳标）两侧瘤
119：40万。
~~123：60万（术后死亡，补一只，未打耳标）~~
122：80万
~~121：20万（术中出血）~~
4）热垫上加热（二档）1h、恢复室温；

观察结果：
1）2025.1.15：121、123号鼠死亡；
2）2025.1.21：119 未标死亡；只剩80万、已长出肿瘤

	长（mm）	宽（mm）
（左）	6.08	4.82
（右）	7.27	4.53

（左）70.62 mm^3　（右）74.59 mm^3

3）2025.2.8：80万　第25天
（左）14.99mm 14.54mm　1584.53 mm^3
（右）14.46mm 17.43mm　1822.23 mm^3

科研名称：细胞培养　日期：2025年1月14日 ~2025.1.17

2025.1.14
1）细胞传代：① 3PNC 1:9 传（3皿）
（P3）3PNC（大皿）：吸去原基 → PBS洗一遍 → 胰酶洗一遍 →(1min) 3ml DMEM → 2ml冻（1.8ml）→ 1ml传代
（2024.11.24冻存）
1ml → 333ml → 333ml → 333ml → 3大皿（1:9传）
1.8ml → 0.9ml + 0.1ml DMSO → 0.9ml + 0.1ml DMSO 冻2管（2025.1.15日取）
② 3PKD（大皿）：吸去原基 → PBS洗一遍 → 胰酶洗一遍 →(1min) 3ml DMEM → 2ml冻（1.8ml）→ 1ml传代
1ml → 500ul → 500ul → 2大皿（1:6传）
1.8ml → 0.9ml + 0.1ml DMSO → 0.9ml + 0.1ml DMSO 冻2管（2025.1.15取）
2）细胞冻存：① 3PKD (P3)（6管 ← 2大皿）2025.1.15取。
［吸去原基 → PBS洗 → 胰酶消 →(1min) 3ml DMEM（DMSO）→ 3管冻存管。］×2
总：冻存 3PNC 2管、3PKD 8管（中皿多）（2025.1.14）

2025.1.15
1）换液：吸去原基 → + DMEM（8ml）、包括 3PNC、5PKD、3P5PNC、3P5PKD。
2）给YxY 100 培养基；

2025.1.16
1）换液：吸去原基 → + DMEM（8ml）、3PNC×3 + 3PKD×2 + 5PKD + 3P5PKD + 3P5PNC
2）传代：5PNC 1:9（小→大）
3）查细胞：3PKD、3P5PNC、3P5PKD、~~3PKD~~
中皿多、细胞量较多

2025.1.17
1）传代：3PNC：1:3 → 2大皿（1ml）吸去原基 → PBS洗 → 胰酶消化 → 3ml DMEM停止消化 → 2025.1.18 注瘤使用
1:9 → 1中皿（150ul）
3PKD同3PNC
2）换液：3PNC、[5PKD、3P5PNC、3P5PKD] 1.15、[5PKD、3P5PNC、3P5PKD] 1.16
3）冻细胞：3PNC×2大皿 → 3管×2　吸去原基 → PBS洗 → 胰酶消化 → DMEM + DMSO 10% 停止消化
3PKD ×1大皿 → 4管 → 1ml/管 → 细胞冻存盒 → -80℃ 过夜。

冻存 3PNC 6管、3PKD 4管（2025.1.17）

骨移（214-/- →WT）（1）

科研名称：原位注射（3P5PNC/KD 3PNC/KD） 日期：2025 年 10 月 13日

原位注射（3P5PNC/KD、3PNC/KD） 2025.10.15

鼠：C57（WT ⇐ 214-/-） 25.6.15生（25.7.29 骨移） → 3P5PNC/KD 10.13
C57（WT ⇐ 214-/- 25.6.10生（25.7.29 骨移） → 3PNC/KD 10.15

细胞：2025.10.13. 3P5PNC/KD cell
10.15 3PNC/KD cell

过程：1）细胞消化：

214-/- → WT

注射时间：2025.10.13-3P5PNC/KD 3P5PNC/KD（未DD）

细胞数量	大小/mm						
高浓度 40万	第9天（2025.10.23）		第11天（2025.10.25）		第13天（2025.10.27）		第15
	L（NC）	R（KD）	L	R	L	R	
289	3.81/4.82	4.81/8.84	4.62/5.40	4.88/10.72	4.72/6.70	5.57/11.55	5.07/
290	3.39/3.53	4.42/5.76	3.49/3.65	4.75/7.07	3.51/6.62	5.01/8.60	3.58/
291	4.18/6.18	3.50/5.52	4.24/6.66	5.77/9.56	4.52/8.60	5.80/9.92	5.52
292	2.95/3.22	3.84/7.24	4.68/4.76	3.94/5.78	4.75/5.86	4.04/8.77	5.88/
293	3.85/4.31	3.21/5.44	3.95/5.34	4.37/8.05	3.98/6.59	4.42/8.35	4.37
294	3.44/4.33	4.26/5.59	3.66/4.90	4.70/6.07	3.92/5.31	4.86/6.98	4.74
高浓度 40万	第17天（2025.10.31）		第19天（2025.11.2）		第21天（2025.11.4）		第2
	L	R	L	R	L	R	
289	6.24/10.29	6.50/13.35	6.71/10.38	7.67/14.51	8.16/12.64	9.63/15.05	8.72
290	4.49/8.44	7.03/9.59	5.24/9.09	7.50/9.71	6.01/10.68	8.69/11.17	7.6
291	6.28/11.53	7.37/11.77	6.38/12.31	7.79/12.35	7.37/13.49	8.09/13.01	8.34
292	6.04/6.59	5.48/10.51	6.48/6.68	5.58/11.72	7.49/8.22	6.00/12.36	7.65
293	6.07/9.78	6.08/10.81	6.48/9.93	6.48/10.99	7.30/10.01	7.27/12.27	7.60
294	5.03/6.28	5.86/7.06	6.05/6.67	5.99/7.42	7.23/8.08	7.23/8.39	7.92
高浓度 40万	第25天（2025.11.8）		第27天（2025.11.10）		第29天（2025.11.12）		第26
	L	R	L	R	L	R	
289	8.61/12.48	10.03/16.84	10.00/13.57	11.89/17.65	10.53/15.77	13.99/18.45	11.2
290	7.63/11.37	9.83/12.91	8.53/11.97	11.20/13.28	8.93/11.65	12.71/14.84	9.99
291	8.35/15.49	9.96/14.76	9.11/16.43	11.67/15.83	10.66/17.88	11.73/17.26	10.8
292	8.06/10.13	9.14/12.93	8.45/11.58	9.80/14.00	9.92/12.90	11.87/15.32	10.0
293	8.86/12.44	9.07/13.97	9.58/12.91	10.63/14.27	11.23/14.31	12.73/15.51	11.48
294	8.51/10.71	8.19/10.55	8.66/12.75	10.37/12.85	10.67/15.49	10.77/13.19	11.72

→ 11.17 收瘤

13
3.40

40万	L	R	L	R	L	R
	[illegible]		[illegible]		第29天（2025.11.14）	
201	9.74/14.56	9.91/14.07	10.57/16.75	11.48/14.59	11.47/17.79	11.69/15.59
202	8.99/15.92	10.27/11.81	10.40/17.52	11.17/12.99	10.52/17.61	11.51/13.21
216	7.73/12.40	8.67/14.91	8.32/13.30	10.16/15.77	9.09/14.80	10.49/15.66
204	10.94/11.55	10.32/14.64	11.01/12.41	11.30/15.21	11.23/12.48	12.27/15.45
205	8.49/14.48	7.00/12.46	9.33/16.24	7.80/13.49	11.06/16.55	8.89/14.03
206	8.16/12.78	8.18/14.92	9.21/14.00	10.32/16.02	10.39/14.72	11.57/16.06

科研名称：5PNC/KD → 原位注射 214-/-（失败） 日期：2025 年 10月 20日

原位注射.

鼠：214-/-（10周）×6.

细胞：5PNC/KD E0771 cell.

过程：

1）鼠脱毛

2）细胞消化

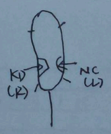
5PNC/KD E0771 cell 吸去原基 → PBS洗一遍 → 胰酶洗一遍 → 37°C，1min；

DMEM（EX，PIS）停止消化 → 800rpm.3min → 弃上清 → + PBS重悬

计数：

	细胞存活率	细胞计数
5PNC	99.86%	1.93×10⁷个/ml
5PKD	99.90%	2.55×10⁷个/ml

3）原位注射（第4对乳腺），40万cell.



10%水合氯醛麻醉 → 切口 → 注射缝合

↑

！麻药有问题．鼠在手术后死亡5只．

结果：

		L（NC）	R（KD）
⑨	25.10.29	4.89/5.98	4.44/7.34
⑪	25.10.31	5.49/6.90	5.40/8.69
⑬	25.11.2	5.56/8.27	6.13/10.44
⑮	25.11.4	6.25/8.30	7.25/10.60
⑰	25.11.6	8.17/10.25	8.43/11.05
⑲	25.11.8	8.64/10.88	9.17/12.91
㉑	25.11.10	8.95/12.05	11.07/13.86
㉓	25.11.12	10.89/13.95	11.84/15.34
㉕	25.11.14	12.48/14.65	13.46/14.30
㉗	25.11.16	13.47/15.93	13.99/14.31
㉙	25.11.18	13.53/17.03	14.00/15.50
㉛	25.11.20	14.27/17.58	14.04/15.92

由于麻药原因
再一次实验.

科研名称：基因鉴定（Geno typing）　日期：2025 年 4月 26日 —4.27

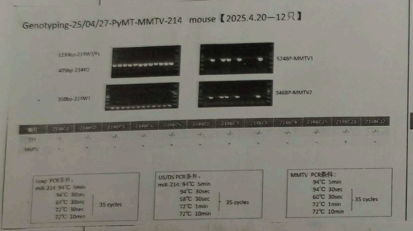
基因鉴定（Genotyping）

鼠：PIP2（10尾、25.4.14）、PIP2（17尾、25.4.20）
BC（4尾）、214（6尾 7-12）　214BC（6尾 +12尾）

过程：2025.4.26：组织裂解 → 构建PCR程序
2025.4.27：PCR → 琼脂糖凝胶电泳。

结果：

Genotyping-25/04/27-PyMT-MMTV-214　mouse【2025.4.20—12只】


1230bp-214WT/FL
405bp-214KO
350bp-214WT
524BP-MMTV1
346BP-MMTV2

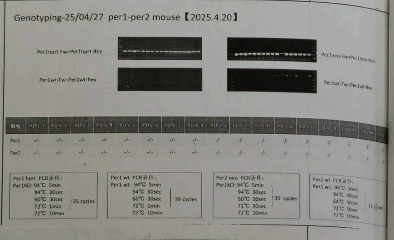
编号	214BC1	214BC2	214BC3	214BC4	214BC5	214BC6	214BC7	214BC8	214BC9	214BC10	214BC11	214BC12
214	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
MMTV	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Loxp PCR条件：
miR-214: 94℃ 5min
94℃ 30sec
64℃ 30sec
72℃ 30sec
72℃ 10min
35 cycles

US/DS PCR条件：
miR-214: 94℃ 5min
94℃ 30sec
58℃ 30sec
72℃ 1min
72℃ 10min
35 cycles

MMTV PCR条件：
94℃ 5min
94℃ 30sec
60℃ 30sec
72℃ 1min
72℃ 10min
35 cycles

Genotyping-25/04/27 per1-per2 mouse【2025.4.20】


Per1hprt-Fw+Per1hprt-Rev
Per1wt-Fw+Per1wt-Rev
Per2neo-Fw+Per1neo-Rev
Per2wt-Fw+Per2wt-Rev

编号	PIP2-1	PIP2-2	PIP2-3	PIP2-4	PIP2-5	PIP2-6	PIP2-7	PIP2-8	PIP2-9	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Per1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Per2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

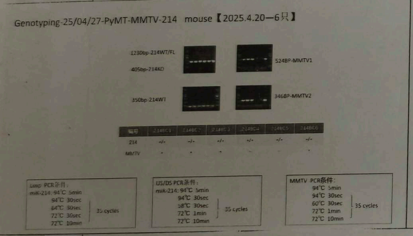
Per1 hprt PCR条件：
Per1KO: 94℃ 5min
94℃ 30sec
60℃ 30sec
72℃ 1min
72℃ 10min
35 cycles

Per1 wt PCR条件：
Per1 wt: 94℃ 5min
94℃ 30sec
60℃ 30sec
72℃ 1min
72℃ 10min
35 cycles

Per2 neo PCR条件：
Per1KO: 94℃ 5min
94℃ 30sec
50℃ 30sec
72℃ 30sec
72℃ 10min
35 cycles

Per2 wt PCR条件：
Per1 wt: 94℃ 5min
94℃ 30sec
64℃ 30sec
72℃ 30sec
72℃ 10min
35 cycles

Genotyping-25/04/27-PyMT-MMTV-214　mouse【2025.4.20—6只】


1230bp-214WT/FL
405bp-214KO
350bp-214WT
524BP-MMTV1
346BP-MMTV2

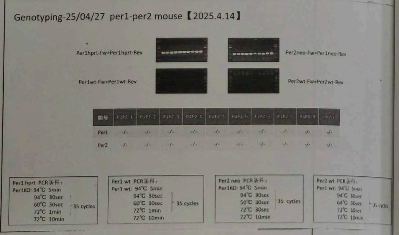
编号	214BC1	214BC2	214BC3	214BC4	214BC5	214BC6
214	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
MMTV	+	+	+	-	-	+

Loxp PCR条件：
miR-214: 94℃ 5min
94℃ 30sec
64℃ 30sec
72℃ 30sec
72℃ 10min
35 cycles

US/DS PCR条件：
miR-214: 94℃ 5min
94℃ 30sec
58℃ 30sec
72℃ 1min
72℃ 10min
35 cycles

MMTV PCR条件：
94℃ 5min
94℃ 30sec
60℃ 30sec
72℃ 1min
72℃ 10min
35 cycles

Genotyping-25/04/27 per1-per2 mouse【2025.4.14】


Per1hprt-Fw+Per1hprt-Rev
Per1wt-Fw+Per1wt-Rev
Per2neo-Fw+Per1neo-Rev
Per2wt-Fw+Per2wt-Rev

编号	PIP2-1	PIP2-2	PIP2-3	PIP2-4	PIP2-5	PIP2-6	PIP2-7	PIP2-8	PIP2-9	[illegible]
Per1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	[illegible]	[illegible]
Per2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	[illegible]	[illegible]

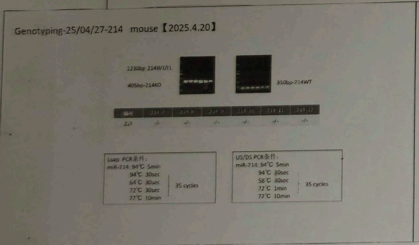
Per1 hprt PCR条件：
Per1KO: 94℃ 5min
94℃ 30sec
60℃ 30sec
72℃ 1min
72℃ 10min
35 cycles

Per1 wt PCR条件：
Per1 wt: 94℃ 5min
94℃ 30sec
60℃ 30sec
72℃ 1min
72℃ 10min
35 cycles

Per2 neo PCR条件：
Per1KO: 94℃ 5min
94℃ 30sec
50℃ 30sec
72℃ 30sec
72℃ 10min
35 cycles

Per2 wt PCR条件：
Per1 wt: 94℃ 5min
94℃ 30sec
64℃ 30sec
72℃ 30sec
72℃ 10min
35 cycles

Genotyping-25/04/27-214　mouse【2025.4.20】

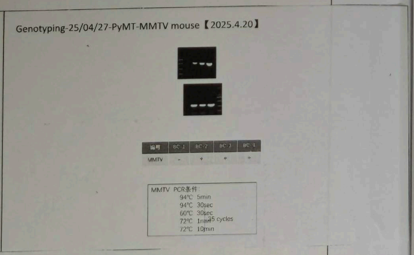

1230bp-214WT/FL
405bp-214KO
350bp-214WT

编号	214-7	214-8	214-9	214-10	214-11	214-12
214	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Loxp PCR条件：
miR-214: 94℃ 5min
94℃ 30sec
64℃ 30sec
72℃ 30sec
72℃ 10min
35 cycles

US/DS PCR条件：
miR-214: 94℃ 5min
94℃ 30sec
58℃ 30sec
72℃ 1min
72℃ 10min
35 cycles

Genotyping-25/04/27-PyMT-MMTV mouse【2025.4.20】



编号	BC-1	BC-2	BC-3	BC-4
MMTV	-	+	+	+

MMTV PCR条件：
94℃ 5min
94℃ 30sec
60℃ 30sec
72℃ 1min
72℃ 10min
35 cycles

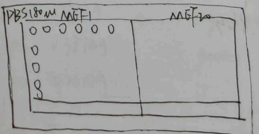
科研名称：细胞抗性测试（2）　日期：2025 年 4月 28日

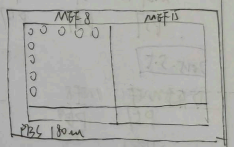
细胞抗性测试

P54　P57　P87　P65
细胞：MEF1、MEF8、MEF20、MEF15
目的：细胞抗性测试 MEF15、MEF20是否均有抗性；
过程：1) 种细胞：25.4.28 9:00-10:00
MEF1、MEF8、MEF15、MEF20　吸去原养 → PBS洗一遍 → 胰酶消化1min
→ 1ml DMEM重悬，停止消化 → 计数。

	细胞活率(%)	细胞个数(个/ml)	量
MEF1	99.81	4.49×10⁶	20.85
MEF8	99.55	1.27×10⁶	70.87
MEF15	99.72	1.94×10⁶	46.4
MEF20	99.74	4.81×10⁶	18.72

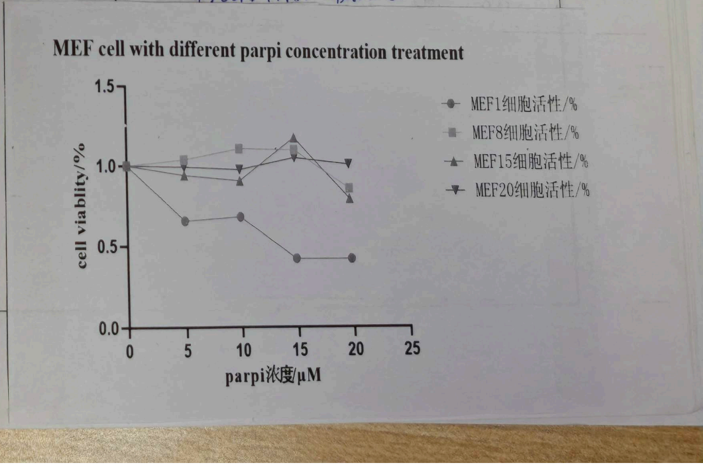
每孔3000个细胞，180μl/孔，每个浓度5个复孔。算30孔量（90000个细胞）


PBS180μl
MEF1
MEF20


MEF8
MEF15
PBS 180μl

2) 换液：25.4.28 17:30.
0 nM、5nM、10nM、15nM、20nM 每种细胞5个浓度，5个复孔 180μl/孔
→ 37℃，细胞培养箱 48h.
3) 染色：Alamar blue 20μl. 2h.
4) 上机检测；　用了CCK8程序：波长不对；

结果：

MEF cell with different parpi concentration treatment